



(19) **SU** (11) **1 526 223** (13) **A1**

(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 1/26//C 12 N 1/26, C**

12 R 1:72

STATE COMMITTEE
FOR INVENTIONS AND DISCOVERIES

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 4328452/13, 16.11.1987

(46) Date of publication: 30.04.1995

(71) Applicant:
Vsesojuznyj nauchno-issledovatel'skij
institut biosinteza belkovykh veshchestv

(72) Inventor: Maksimova G.N.,
Nikolin S.I., Vinarov A.Ju., Konobrij
V.N., Volovnenko A.F., Platonov Ju.V., Burevich
Z.V., Morozova G.R.

(54) METHOD OF PREPARING OF YEAST BIOMASS

(57) Abstract:

FIELD: microbiological industry.
SUBSTANCE: yeast is grown under aeration conditions on the aqueous nutrient medium containing purified liquid paraffins as a carbon source and mineral sources of nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium, trace elements. Sodium sulfite (0.0005-0.001%) and suspension of higher fungi mycelium Polyporus coprinus and others

obtained by submerged cultivation were used as stimulating agents for yeast growth. These components were mixed under aeration conditions with trace elements solution (iron, zinc, manganese sulfates) at pH 2-4 and fed for yeast fermentation at concentration 0.005-0.000005% to flow.
EFFECT: increased biomass yield, improved quality of product, decreased cost. 3 tbl

SU 1 5 2 6 2 2 3 A 1

SU 1 5 2 6 2 2 3 A 1



(19) **SU** (11) **1 526 223** (13) **A1**

(51) МПК⁶ **C 12 N 1/26//C 12 N 1/26, C 12**

R 1:72

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО
ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ
СССР**

(21), (22) Заявка: 4328452/13, 16.11.1987

(46) Дата публикации: 30.04.1995

(56) Ссылки: Авторское свидетельство СССР N 119410, кл. С 12N 1/16, 1965.Авторское свидетельство СССР N 1044033, кл. С 12N 1/16, 1983.

(71) Заявитель:
Всесоюзный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ

(72) Изобретатель: Максимова Г.Н.,
Николин С.И., Винаров А.Ю., Конобрий
В.Н., Воловненко А.Ф., Платонов
Ю.В., Буревич З.В., Морозова Г.Р.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ДРОЖДЕЙ

(57)

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано для получения кормовой биомассы, а также в медицинской, пищевой и других отраслях промышленности. Целью изобретения является повышение выхода биомассы, улучшение качества готового продукта, а также удешевление процесса. Способ заключается в том, что дрожжи выращивают в условиях аэрации на водной питательной среде, содержащей в качестве источника углерода очищенные

жидкие парафины и минеральные источники азота, фосфора, калия, магния, микроэлементов, а в качестве стимуляторов роста дрожжей на стадии выращивания сернистокислый натрий (0,0005 - 0,001%) и полученную при глубинном культивировании суспензию мицелия высших грибов *Polyporus*, *Coprinus* и др., которую в условиях аэрации смешивают с раствором микроэлементов (сернокислые соли железа, цинка, марганца) при pH 2,0 - 4,0 и подают на ферментацию дрожжей в количестве 0,005 - 0,000005% к протоку. 3 табл.

SU 1 5 2 6 2 2 3 A 1

SU 1 5 2 6 2 2 3 A 1

S U
1 5 2 6 2 2 3 A 1

S U
1 5 2 6 2 2 3 A 1

Изобретение относится к микробиологическому синтезу белка и может быть использовано для получения биомассы микроорганизмов, в частности дрожжей, например, на очищенных жидкых парафинах.

Целью изобретения является повышение выхода биомассы, улучшение качества готового продукта, а также удешевление процесса.

Способ заключается в том, что дрожжи выращивают в условиях аэрации периодическим, приточно-отъемным или непрерывным способом на жидких питательных средах, содержащих источники углерода, например очищенные жидкие парафины, и минеральные источники азота, фосфора, калия, магния, микроэлементов.

При этом в качестве стимуляторов роста дрожжей на стадии выращивания используют сернистокислый натрий (0,0005-0,0020%) и полученную при глубинном культивировании супензию мицелия высших грибов родов *Polyporus*, *Coprinus* и других, которую подкисляют, смешивая с раствором микроэлементов (сернистые соли железа, цинка, марганца) при pH 2,0-4,0, и подают на ферментацию дрожжей в количестве 0,05-0,000005% к протону.

Выращивание дрожжей проводят как в условиях периодического, так и непрерывного культивирования при pH 3,8-5,5, t 32-40°C и скорости протока 0,1-0,35 ч⁻¹.

При этом было установлено, что биологическая активность грибного мицелия, выдержанного смешиванием с раствором микроэлементов при определенных условиях (pH 2,0-4,0), т.е. его стимулирующее действие на рост дрожжей значительно увеличивается, что проявляется прежде всего в резком сокращении количества подаваемого на ферментацию стимулятора (в 1500-50000 раз), причем одновременное использование стимуляторов дает результат, не равный сумме результатов, получаемых от применения каждого стимулятора в отдельности, что наглядно видно из приведенных в табл. 1-3, а также в примерах данных.

В табл.1 приведены результаты по изучению влияния различных значений pH выдерживания грибного мицелия *Polyporus sguamosus* ВСБ-917 (ЦПМП-F169) на его стимулирующее действие. Биологическую активность, т. е. стимулирующее действие грибного мицелия на рост парафинокисляющих дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМПМ-7262) определяли выращиванием биомассы в колбах на качалке в течение 24 ч при t 32-34°C и установлением ее относительного прироста.

Как видно из табл. 1, при выдерживании грибного мицелия с раствором микроэлементов максимальная биологическая активность, т.е. стимулирующее действие грибного мицелия *Polyporus sguamosus* на рост парафинокисляющих дрожжей имеет место при pH 3,0-3,5, при этом активация стимулятора отмечается в интервале pH 2,0-4,0.

При выдерживании супензии грибного мицелия при более высоких значениях pH среды (pH 5,0 и pH 5,5) активация стимулятора не наблюдается, а выдерживание супензии грибного мицелия

при значениях pH среды, меньших pH 2, нецелесообразно, так как активация стимулятора незначительная, а технически выполнение процесса затрудняется, так как требует наличия кислотоупорного оборудования и трубопроводов.

Как видно из табл. 2, после выдерживания супензии грибного мицелия ЦПМП-F169 в растворе солей при pH 3,1 его биологическая активность существенно увеличивается, т.е. стимулирующее действие на рост парафинокисляющих дрожжей проявляется при концентрации стимулятора в 1 10³-1 10⁶ меньшей, чем при подаче его непосредственно после выращивания грибного мицелия при pH 5,5-6,5. Дрожжи *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМПМ-У262)

выращивали периодически в колбах на качалке на минеральной среде, содержащей в качестве источника углерода 1,0 об. очищенных жидких парафинов фракции C 10-C₁₉. Выращивание дрожжей проводили в течение 24 ч.

Как видно из табл.3 биологическая активность грибного мицелия после обработки в соответствии с примечанием существенно увеличилась, а именно стимулирующее действие его проявляется при концентрации в 5000 раз меньшей, чем в контроле по прототипу (гриб без обработки), при этом выход биомассы выше, чем в контроле (без добавок гриба), на 10,5% и на 9,1% больше, чем по прототипу. Относительный прирост продуктивности на 13,5% выше, чем в контрольном варианте, и на 12,08% выше, чем по прототипу.

П р и м е р 1. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМПМ-У262) выращивали периодически в колбах на качалке с объемом питательной среды 100 мл, которая включала в себя 10,0 г/л NH₄H₂PO₄, 7,0 г/л K₂HPO₄, а также микроэлементы, раствор которых предварительно смешивали при аэрации при pH 3,1 с супензией грибного мицелия с тем, чтобы концентрация этих компонентов в растворе питательной среды составляла, г/л: MgSO₄·x7H₂O 0,58; FeSO₄ · 7H₂O 0,116; FeSO₄·x7H₂O 0,052; MnSO₄ · 5H₂O 0,0131, а супензии грибного мицелия *Polyporus sguamosus* 0,01 об.

В колбу добавляли также 1 об. очищенных жидких парафинов фракции C₁₀-C₁₉ и производили выращивание дрожжей при t 32-34°C, pH 5,5. Концентрация биомассы составила 4,61 г/л, выход биомассы составил 59,87% В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы 4,96 г/л, т.е. выход биомассы составил 64,42%. В контроле по прототипу, т.е. при добавлении 0,02% супензии необработанного грибного мицелия, взятого непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6,0 концентрация биомассы составила 5,28 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%.

П р и м е р 2. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМПМ-У262) выращивали на среде и в условиях по примеру 1. При этом концентрация супензии грибного мицелия *Polyporus sguamosus* составила 0,005 об.

Концентрация биомассы в колбе составила 5,14 г/л, выход биомассы составил 67,75% В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы составила 4,97 г/л, т.е. выход биомассы

S U 1 5 2 6 2 2 3 A 1

A 1
S U 1 5 2 6 2 2 3

составил 64,42%

По прототипу, т.е. при добавлении 0,02% супензии необработанного мицелия, взятой непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6,0 концентрация биомассы составила 5,08 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

П р и м е р 3. Дрожжи *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМПМ-У262) выращивали на среде и в условиях по примеру 1. В качестве биостимулятора в колбы вносили 0,00005 об. супензии грибного мицелия *Polyporus squamatus*, предварительно выдержанной при аэрации и перемешивании в течение 20 ч при pH 3,1. Концентрация биомассы составила 5,51 г/л, выход биомассы составил 71,56%. В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы составила 4,96 г/л, т.е. выход биомассы составил 64,4%

По прототипу, т.е. при добавлении 0,02% супензии необработанного грибного мицелия, взятой непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6 концентрация биомассы составила 5,08 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

П р и м е р 5. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМПМ-У262) выращивали на среде и в условиях по примеру 1. В качестве биостимулятора в колбы вносили 0,000005 об. супензии грибного мицелия, предварительно выдержанной при аэрации и перемешивании в течение 20 ч при pH 3,1. Концентрация биомассы составила 5,02 г/л, выход биомассы составил 65,19%. В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы составила 4,96 г/л, т.е. выход биомассы составил 64,42%

По прототипу, т.е. при добавлении 0,02% супензии необработанного мицелия, взятой непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6,0 концентрация биомассы составила 5,08 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

П р и м е р 5. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМПМ-У262) выращивали на среде и в условиях по примеру 1. В качестве биостимулятора в колбы вносили 0,000001 об. супензии грибного мицелия, предварительно смешанной при аэрации и перемешивании с раствором микроэлементов при pH 3,1. Концентрация биомассы составила 4,98 г/л, выход биомассы составил 64,68%. В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы составила 4,96 г/л, т.е. выход биомассы составил 64,42%

По прототипу, т.е. при добавлении 0,02% супензии необработанного мицелия, взятой непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6,0 концентрация биомассы составила 5,08 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

П р и м е р 6. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМПМ-У262) выращивали непрерывно в десятилитровом аппарате с рабочим объемом 5 л на минеральной среде, содержащей следующие соли, г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,10; H_3PO_4 (70%-ной) 2,14; KCl 1,34; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,81; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,162; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,072; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,018.

При этом при приготовлении рабочего раствора солей раствор макро- и микроэлементов смешивали отдельно. В раствор микроэлементов (MgSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4) при pH 2,9 добавляли супензию грибного мицелия *Fusarium culmorum* так, чтобы его концентрация в

аппарате составляла 0,00005 об. В аппарат также добавляли 375 мл/ч отработанной культуральной жидкости (ОЮК), т.е. 30% от общего протока в ферментере.

В ОЮК предварительно растворяли натрий сернистокислый в количестве 10 мл, что составило 0,0008% от общего протока в аппарате или 0,0026% от объема рециркулируемой культуральной жидкости.

В качестве источника углерода в аппарат добавляли 30 мл/ч очищенных парафинов.

Дрожжи выращивали непрерывно при скорости разбавления среды 0,25 ч⁻¹, при температуре 32-34°C, аэрации воздухом 1,8 л/л/ч, числе оборотов мешалки п 1200 об/мин. При этом концентрация биомассы составила 20,77 г/л (асд), выход биомассы составил 115,71% продуктивность 5,19 г/л/ч. Расходный коэффициент составил 0,86 т/т готового продукта.

В контрольном опыте, т.е. без добавок стимуляторов при тех же условиях выращивания концентрация биомассы составила 16,56 г/л, т.е. выход биомассы составил 94,3%. Расходный коэффициент составил 1,06 т/т готового продукта.

Содержание сырого протеина в опыте составило 62% содержание остаточных углеводородов составило 1,8% в контрольном опыте содержание остаточных углеводородов составило 2,9% сырого протеина 59,7%

Удельный расход супензии грибного мицелия составил 0,024 г/кг (0,024 кг/т готового продукта), в то время как контроль по прототипу 30 кг/т готового продукта.

П р и м е р 7. Дрожжи *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМПМ-У262) выращивали по примеру 6.

В аппарат добавляли 0,00001 об. супензии грибного мицелия *Fusarium culmorum*. В аппарат добавляли также 25 мл/ч отработанной культуральной жидкости (ОЮК), т.е. 50% от общего протока в ферментере. В ОЮК предварительно растворяли натрий сернистокислый в количестве 25 мг, что составляло 0,002% от общего протока в аппарате или 0,004% от объема рециркулируемой культуральной жидкости.

В качестве источника углерода в аппарат добавили 30 мл/ч очищенных парафинов.

При этом концентрация биомассы составила 20,38 г/л (асд), выход биомассы составил 113,56% продуктивность процесса 5,09 г/л/ч, расходный коэффициент по парафину 0,88 т/т готового продукта.

П р и м е р 8. Дрожжи *Candida maltosa* ВСБ-778 выращивали непрерывно в десятилитровом аппарате с рабочим объемом среды 5 л на минеральной среде, содержащей, г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5; H_3PO_4 (70%-ной) 1,53; KCl 0,96; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,58; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0116; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,062; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0131.

В питательную среду добавляли 2,5 об. к протоку парафина, а также сульфит натрия и супензию мицелия гриба *Polyporus squamosus* ВСБ-917 в следующем порядке: сначала в течение 8 ч подавали одновременно 0,0008% к протоку сульфит натрия и 0,00001 об. супензии грибного мицелия, выдержанного в растворе солей микроорганизмов (цинка, железа, марганца и магния) при pH 3,1; затем в течение 8 ч подавали 0,0008% к протоку сульфит натрия,

СУ 1526223 А1

а в следующие 8 ч подавали лишь грибной биостимулятор, после чего повторяли тот же порядок подачи стимуляторов. Выращивание дрожжей вели при $d 0,25 \text{ ч}^{-1}$.

При этом концентрация биомассы составляла 20,9 г/л, т.е. выход биомассы от заданного парафина равнялся 107,1% продуктивность процесса 5,22 кг/м³ч. В контролльном варианте, который проводили в тех же условиях, но без указанной подачи стимуляторов, концентрация биомассы составила 17,5 г/л, т.е. выход биомассы составил 89,6% продуктивность процесса составила 4,37 кг/м³ч.

Таким образом, предлагаемый способ по сравнению с известным позволяет повысить выход биомассы, улучшить качество целевого продукта за счет снижения содержания остаточных углеводородов и повышения содержания сырого протеина, а также добиться удешевления процесса за счет снижения концентрационного порога стимулятора, снижения расходного

коэффициента (данные приведены в таблицах и примерах).

Формула изобретения:

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ, предусматривающий выращивание их в условиях аэрации на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода н-парафины, источники азота, фосфора, раствор микрозлементов, содержащий сернокислые соли железа, цинка, марганца, сульфит натрия и суспензию мицелия высших грибов в качестве стимуляторов роста, с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода биомассы, улучшения качества готового продукта, а также удешевления процесса, суспензию мицелия высших грибов предварительно подкисляют путем смешивания с раствором микрозлементов и подают в процесс выращивания в количестве 0,005-0,000005 об. к протоку совместно или поочередно с сульфитом натрия.

25

30

35

40

45

50

55

60

СУ 1526223 А1

Таблица 1

Влияние различных значений pH выдерживания грибного мицелия ЦПМП-Ф169 на его стимулирующее действие (концентрация суспензии грибного мицелия 0,0001%)

pH выдерживания грибного мицелия	Концентрация биомассы, г/л	Относительный прирост биомассы, %	Выход биомассы от сырья, %	Увеличение хода биомассы, %
Контроль грибного мицелия без изменения, pH,				
5,5	0,371	-	48,18	-
2,0	0,379	2,16	49,22	1,04
2,5	0,391	3,23	50,78	2,60
3,0	0,409	10,24	53,12	4,94
3,5	0,405	9,16	52,60	4,42
4,0	0,392	5,66	50,91	2,13
5,0	0,375	1,07	48,18	-

Таблица 2

Влияние концентрации суспензии грибного мицелия *Polyporus sguamosus* ВСБ-917 (ЦПМП-Ф169) на его биологическую активность после выдерживания его в растворе солей при pH 3,1 в процессе выращивания дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМПМ-У262)

Концентрация стимуляторов, %	Прирост биомассы, г/л	Прирост биомассы, отн. %	Выход биомассы, %	Увеличение выхода биомассы, %
Контроль (без добавок)	4,96	-	64,42	-
0,01	4,61	-7,05	59,87	-4,55
0,005	5,14	3,62	66,75	2,33
0,001	5,35	7,87	69,48	5,06
0,0005	5,51	11,09	71,56	7,14
0,0001	5,41	9,07	70,25	5,83
0,00005	5,33	8,67	69,22	4,80
0,00001	5,09	2,62	66,10	1,68
0,000005	5,02	1,21	65,19	0,77
0,000001	4,98	0,41	64,68	0,26
Контроль по прототипу (0,05% грибного мицелия при pH 6,00)	5,08	2,41	65,97	1,55

SU 1 5 2 6 2 2 3 A 1

SU 1 5 2 6 2 2 3 A 1

Таблица 3

Результаты совместного действия сернистокислого натрия и суспензии грибного мицелия *Fusarium culmorum* ВСБ-927 (ЦПМП-F258) после его выдерживания с раствором микроэлементов при pH 3,1 на рост парафинокисляющих дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМПМ-Y261) в условиях непрерывного культивирования

Параметры способа	Контроль	Контроль по прототипу (гриб без обработки) 0,05% к протоку или 30 г/кг	Сульфит натрия 0,001%	Грибной мицелий после обработки 0,00005% к протоку или 0,03 г/кг*	Сульфит натрия 0,0001% и грибной мицелий после обработки 0,00005%
Объем аппарата, л	5	5	5	5	5
Отбор л/ч	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27
Подача парафина, мл/ч г/л	30 17,95	30 17,95	30 17,95	30 17,95	30 17,95
Время выращивания, ч	3,93	3,93	3,93	3,93	3,93
Скорость разбивления, ч ⁻¹	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Концентрация биомассы, г/л	16,56	16,81	18,10	18,82	20,77
Производительность процесса (удельная) г/л	4,14	4,20	4,52	4,70	5,19
Выход биомассы, %	94,30	95,72	100,82	104,84	115,71
Раствор рO ₂ , %	1,9	-	2,24	1,23	1,47
Расходный коэффициент	1,06	1,04	0,99	0,95	0,85
Увеличение производительности процесса, отн. %	-	1,44	9,17	13,52	25,36

Приимечание. Условия обработки грибного мицелия *Fusarium culmorum* ВСБ-927 (ЦПМП-F258): выращивание грибного мицелия при t° = 26°C, конечный pH после выращивания pH 5,6; по окончании процесса выращивания довели pH до 3,1, смешали с раствором микроэлементов, при аэрации воздухом выдерживали в течение 2 ч и затем направили на ферментацию в количестве 0,00005%.

SU 1526223 A1

SU 1526223 A1